Histoire phylogéographique des loups gris Européens

Pilot *et al. BMC Evolutionary Biology* 2010, **10**:104
http://www.biomedcentral.com/1471-2148/10/104

BMC Evolutionary Biology

RESEARCH ARTICLE Open Access

Phylogeographic history of grey wolves in Europe

Małgorzata Pilot*[1], Wojciech Branicki[2,3], Włodzimierz Jędrzejewski[4], Jacek Goszczyński[5], Bogumiła Jędrzejewska[4], Ihor Dykyy[6], Maryna Shkvyrya[7] and Elena Tsingarska[8]

CONTEXTE

Les processus historiques pendant les glaciations du Pléistocène ont eu un effet profond sur la différenciation génétique intra-spécifique [1-3]. Chez de nombreuses espèces existantes, les lignées distinctes au niveau de l'ADN mitochondrial (mt) ne chevauchent pas la répartition géographique, qui peut résulter de leur isolement dans différents abris glaciaires pendant le dernier Maximum glaciaire (LGM, 21 000 à 17 000 ans B.P.) [4]. Les divergences génétiques entre ces lignées d'ADNmt sont souvent datées du début du Pléistocène ou du Pliocène [1-5], ce qui peut suggérer une séparation géographique à long terme.

Cependant, des études récentes basées sur l'ADNmt conservé dans des restes de mammifères du Pléistocène tardif ont montré qu'une association entre structure phylogénétique et géographique n'implique pas nécessairement un isolement génétique à long terme [6-9]. Dans la grotte des hyènes *Crocuta crocuta spelaea*, la grotte des ours *Ursus spelaeus* et des ours bruns *U. arctos* vivant en Europe avant le LGM ne présentent pas de motifs phylogéographiques similaires à ceux observés chez les espèces existantes [8]. Sur la base de cette découverte, il a été suggéré que les modèles phylogéographiques actuels sont des reliques transitoires de la dernière glaciation [8]. D'autre part, l'étude de l'Ours bruns du Pléistocène supérieur de la Béringie orientale (contemporain de l'Alaska) a révélé qu'un important changement phylogéographique s'est produit entre 35000 et 21000 ans B.P. (donc avant le LGM) et la structure génétique de la population qui s'est formée pendant ce temps a persisté jusqu'à présent [7]. L'étude des anciens loups gris *Canis lupus* de Béringie indiquait la disparition d'une lignée entière d'ADNmt à la fin du Pléistocène, et a montré qu'elle reflétait l'extinction d'un loup écomorphe distinct [10]. La perte de l'une des deux principales lignées d'ADNmt a également été révélée chez le mammouth laineux *Mammuthus primigenius* il y a environ 44000 ans B.P. [11]. Toutes ces études sont cohérentes et montrent la grande complexité de l'histoire des populations du quaternaire, contrastant avec l'idée de lignées géographiquement fixe tout au long de la période subséquente des cycles glaciaires. Cependant, un mécanisme général sous-tendant ces histoires de population spécifiques à l'espèce, conduisant à l'extinction de certaines lignées ou d'espèces entières et la survie des autres, reste encore floue [11,12].

Dans cette étude, nous avons abordé cette question en reconstruisant l'histoire phylogéographique des loups gris européens, basée sur l'analyse de la variabilité de l'ADNmt de populations existantes et la comparaison avec des données anciennes. L'histoire du Pléistocène tardif de cette espèce a déjà été étudiée en Amérique du Nord [10], permettant une comparaison entre les histoires évolutives de la même espèce sur différents continents.

METHODES

Matériaux

Nous avons collecté des informations sur la région de contrôle de la séquence de l'ADNmt de 947 loups contemporains de 23 pays européens, sur la base de nos données publiées [13] et nouvelles (pour 674 individus de 11 pays au total) et des études d'autres auteurs [14-17] (pour plus de détails, voir les données Supplémentaires). Étant donné que les séquences analysées dans différentes études incluaient différents fragments de région de contrôle, seul un fragment de 230 **paires de bases** (pb) commun à toutes les séquences pourrait être comparé. Par conséquent, nous avons séquencé un autre fragment de région de contrôle utilisant les amorces L16462 et H222 [18] pour 42 loups, portant chacun des 22 haplotypes détectés dans la réf. [13] (w1-w22, voir le tableau S1 dans Fichier supplémentaire 1), en sélectionnant deux individus représentant les emplacements géographiques les plus éloignés de chaque haplotype, sauf pour les haplotypes w18 et w20, chacun détecté avec un individu seulement. En combinant ce nouveau fragment avec le fragment que nous avions séquencé plus tôt (voir Réf. [13]), nous avons obtenu des séquences de la région de contrôle de 661 pb. Nous avons aussi extrait des séquences GenBank de même longueur pour trois haplotypes européens supplémentaires (w24, w26 et w27), les loups indiens et himalayens, ainsi que les coyotes *C. latrans*, qui ont été utilisés comme groupe externe (pour plus de détails, voir Fichier supplémentaire 1). Ces séquences plus longues ont été utilisées pour effectuer des analyses phylogénétiques supplémentaires, mais n'a pas pu être utilisé pour les analyses génétiques de population, en raison du nombre d'échantillons séquencés.

Afin d'évaluer le niveau de caractère distinctif des populations européennes et leur contribution à la variabilité génétique globale de l'espèce, nous avons analysé les relations entre les loups européens et leurs conspécifiques d'autres continents. Pour cela, nous avons collecté les données de séquence de la région de contrôle de l'ADNmt sur les loups gris d'Asie et d'Amérique du Nord, d'études publiées [14,15,19-23] et de base de données NCBI (Tableau S1 dans le fichier supplémentaire 1). Nous avons comparé les 230 pb du fragment, commun à toutes les séquences considérées.

Nous avons ensuite comparé les séquences d'ADNmt de loups avec des séquences publiées de 24 anciens loups d'Europe [GenBank : DQ852634-DQ852637, DQ852643-DQ852662] [24]. Ces séquences ont été produite en utilisant des procédures de laboratoire garantissant une grande fiabilité des données résultantes (pour plus de détails, voir Réf. [24]). L'âge des échantillons anciens variaient entre 44 000 et 1 200 ans B.P., et leur répartition tout au long de cette période était presque uniforme, à l'exception de l'absence d'échantillons de la période comprise entre 14000 et 2000 ans B.P. (Figure S1 dans le fichier supplémentaire 1). Bien que les séquences anciennes disponible étaient courtes - seulement 57 pb [24], elles incluent 19 sites informatifs sur 23 parcimonies présentées dans le fragment de 230 pb, que nous avons analysé pour les loups du monde entier (Figure S2 dans le fichier supplémentaire 1). Ainsi, ces courtes séquences étaient suffisamment informatives pour déduire la position phylogénétique des anciens loups, par rapport à leurs conspécifiques contemporains.

Analyse des relations phylogénétiques entre l'ADNmt des haplotypes du loup

Nous avons analysé les relations phylogénétiques entre (**a**) les loups gris européens basés sur une séquence de régions de contrôle de 230 pb, (**b**) les loups gris européens contemporain basés sur une séquence étendue de 661 pb, (**c**) les loups gris contemporain du monde entier, basés sur les mêmes 230 séquences bp, et (**d**) les loups gris européen ancien et existant, basé sur une séquence de 57 pb. Les arbres phylogénétiques ont été construits dans PAUP 4.0b10 [25], utilisant une évolution minimale, un maximum de vraisemblance, et une méthode de parcimonie maximale. Les deux derniers arbres ont été obtenus en utilisant l'algorithme de recherche heuristique. Pour les arbres basés sur la distance et la vraisemblance, nous avons utilisé un modèle de substitution de nucléotides estimée dans Modeltest 3.6 [26]. La confiance dans les relations estimées a été déterminée en calculant les valeurs bootstrap avec 1000 répliques. Les phylogénies étaient enracinées avec des séquences de coyote de GenBank.

De plus, nous avons construit des arbres bayésiens à MrBayes 3.2 [27] en utilisant un modèle de substitution nucléotidique estimée dans MrModeltest 2.2 [28]. Nous avons utilisé un coalescent a priori sur les longueurs de branche (ce qui implique un forçage de **l'horloge moléculaire**) et les paramètres par défaut des autres paramètres. Pour une comparaison, nous avons également utilisé un a priori exponentiel sur la longueur de branche. Nous avons effectué deux tests indépendants et simultanés

qui fonctionne avec quatre chaînes MCMC chacune. La période jusqu'à l'écart type des fréquences séparées pour les deux échantillons d'arbres sont tombés sous 0,01 (indiquant une convergence à la distribution stationnaire) a été traité comme « burnin ». Les analyses ont duré aussi longtemps que cette période de rodage constituait les 10 premiers % des générations (soit 5000000- 30 millions de générations au total, selon les jeux de séquences analysés).

Nous avons également construit des réseaux d'haplotypes en utilisant la méthode des statistiques de parcimonie implémentée dans le logiciel TCS [29] et la méthode de jonction médiane implémentée dans le logiciel Network 4,510 [30]. Le réseau TCS était imbriqué selon les règles décrites dans Templeton et al. [31] et Templeton & Sing [32]. Les relations phylogénétiques parmi les haplotypes d'ADNmt des loups gris **ancien** et **contemporain** ont été réalisées en utilisant la méthode de réseau uniquement, en raison de la séquence très courte des données.

Analyse des modèles phylogéographiques et démographiques des populations passées

Pour tester si l'ensemble des échantillons analysés est suffisamment grand pour refléter correctement la variabilité de l'ADNmt des loups européens, nous avons estimé le nombre total d'haplotypes attendus en Europe, en utilisant la méthode de la courbe de raréfaction [33] qui trace le cumul du nombre d'haplotypes trouvés avec un échantillon de taille croissante (pour plus de détails, voir le fichier supplémentaire 1). Nous avons effectué cette analyse pour tous les loups européens ainsi que pour les loups européens uniquement (c'est-à-dire en excluant les populations des Apennins). Nous avons ensuite utilisé l'ensemble de l'échantillon européen pour comparer la distribution géographique et les fréquences des principaux groupes d'haplotypes pour les loups **antiques** de différentes parties de l'Europe.

Nous avons appliqué plusieurs modèles coalescents (population de taille constante, croissance exponentielle, croissance d'expansion et Bayesian skyline plot) implémenté dans le logiciel BEAST 1.4.6 [34] pour reconstruire la dynamique démographique passée des loups européens. Cette analyse était basée sur l'alignement des séquences d'ADNmt de l'époque contemporaine et ancienne (pour plus de détails sur l'analyse, voir le fichier supplémentaire 1). Parce que tous les haplotypes anciens étaient étroitement liés aux contemporains, et trois haplotypes partagés entre les échantillons anciens et contemporains (voir Résultats), nous avons supposé que les loups anciens et contemporains représentent la même population à des périodes différentes. Seulement les échantillons anciens avec la datation exacte au radiocarbone (comme rapportés dans la référence [24]) ont été utilisés dans cette analyse, et l'âge des échantillons ont été daté au radiocarbone moyen non étalonné. Le taux de substitution a été estimé à partir des données. Les graphiques des changements démographiques historiques ont été construits en utilisant TRACER 1.4 [35]. Pour tester lequel des modèles coalescents correspondent mieux aux données, nous les avons comparés en utilisant les valeurs de facteurs de Bayes.

Parce que l'utilisation de séquences courtes (57 pb) disponibles pour les loups anciens pouvaient biaiser les résultats, nous avons effectué la même analyse, basée sur la plus longue séquence contemporaine uniquement, à titre de comparaison. Dans ce cas, nous avons utilisé un taux de substitution de 5×10^{-8} [14], calculé sur la base de séquences divergentes entre le loup gris et le coyote. Utiliser un taux de substitution calibré par des divergences entre espèces, peut conduire à une surestimation des temps de divergence récents [36]. Ainsi, on s'attend à ce que les temps de divergence basé sur le taux de substitution estimé à partir des données anciennes et les données fixes peuvent différer, mais si les deux ensembles des données analysées contiennent suffisamment d'informations pour reconstruire l'histoire de la population, les changements de la démographie historique doivent être similaires (sauf pour leur calendrier).

L'expansion démographique historique suggérée par l'analyse BEAST a ensuite été testée en appliquant des statistiques génétiques de la population à partir de séquences ADN moderne. Les données anciennes ont été exclues de ces analyses en raison de leur courte longueur et parce que leur inclusion pourrait considérablement biaiser les résultats [37]. Nous avons effectué l'analyse de la

distribution des discordances [38], où nous avons compté chaque haplotype présent dans une population locale une seule fois (pour éliminer le biais lié à la présence probable de proches parents ; voir Réf. [39]), mais nous avons compté l'haplotype plus d'une fois, lorsqu'il a été trouvé dans différentes populations locales. Nous avons également effectué le test de F_u sélectif de neutralité, où une valeur F_s négative significative (avec $P < 0,02$) indiquerait une expansion démographique [40]. Nous avons calculé la diversité nucléotidique (π), la diversité haplotypique (H_D), et le rapport entre le nombre de sites variables (*s*) et le nombre moyen de différences nucléotidiques par paires (*d*). Les populations qui ont connu une expansion démographique récente ont un H_D élevé avec un π faible et un rapport *s/d* élevé [41]. Nous avons appliqué le logiciel Arlequin 3.1 [42] pour ces analyses.

RESULTATS

Relations phylogénétiques entre les haplotypes d'ADNmt de loups contemporains d'Europe et d'autres continents

La comparaison de la région de contrôle de séquences d'ADNmt de **230 paires de bases** de 947 loups européens contemporains a révélé **27 haplotypes** différents (tableau S1 dans fichier 1). Sur la base des arbres phylogénétiques et des réseaux construits, nous avons défini **deux haplogroupes**, 1 et 2 (Figure 1 et la figure S3 dans le fichier supplémentaire 1). L'haplogroupe 1 constitue un clade monophylétique, soutenu par toutes les méthodes phylogénétiques appliquées (bien que le support du bootstrap soit faible). Tous les autres haplotypes ont été attribués à l'haplogroupe 2, qui a été pris en charge en tant que clade par des méthodes basées sur le réseau et certaines méthodes basées sur des arbres, tandis que d'autres méthodes ont montré qu'il se composait de plusieurs petits clades ayant une position basale dans un arbre. Dans un arbre bayésien construit avec un a priori coalescent, l'haplogroupe 2 avait une crédibilité de support de clade de 0,85. Dans tous les arbres et réseaux construits, les haplotypes des deux groupes étaient clairement séparés, bien qu'ils ne constituent pas toujours deux clades monophylétiques (voir le fichier supplémentaire 1 pour la discussion sur la définition de l'haplogroupe). La seule incohérence entre les différentes méthodes phylogénétiques a concerné l'attribution d'haplogroupes de l'haplotype **w20**. Cependant, cet haplotype n'a été trouvé que chez un individu prélevé en bordure de la zone d'étude (en Turquie), et donc une éventuelle mauvaise affectation n'entraînerait qu'un biais mineur des résultats. Comme suggéré par la plupart des méthodes, cet haplotype a été affecté à l'haplogroupe 1. Les deux haplogroupes étaient séparés par cinq étapes mutationnelles : trois **transitions**, une **transversion** et une **insertion/suppression**. La séquence divergente entre ces haplogroupes était de 0,030, et la divergence nette de séquence (tenant compte de la divergence au sein des haplogroupes) était de 0,013.

L'analyse de séquences plus longues (**661 paires de bases**) pour 42 individus européens sélectionnés, ont révélé **33 haplotypes**, dont deux ont déjà été signalés dans GenBank précédemment [numéros d'accès : AF008139, AF098123, FJ978005-FJ978035]. Trois haplotypes européens supplémentaires de même longueur (w24, w26 et w27) étaient extrait de GenBank [AF008137, AF098115 et AB007372]. Dans 11 cas, nous avons trouvé des différences de séquences de 661 pb et 230 pb entre individus partageant le même haplotype. Deux haplotypes issus du même court haplotype ont été marqués avec les extensions A et B, et étaient étroitement apparentés, sauf pour les haplotypes w7A et w7B (Figure S4 dans le fichier supplémentaire 1). La topologie de l'arbre phylogénétique a confirmé que l'haplogroupe 1 constitue un clade monophylétique, tandis que les haplotypes de l'haplogroupe 2 avaient une position basale dans la phylogénie et formaient 2-3 clades plus petites (figure S4 dans le fichier supplémentaire 1). Bien qu'il n'y eût pas de support bootstrap pour les branches principales de l'arborescence, la subdivision en deux haplogroupes principaux était conforme à la subdivision basée sur des séquences, et aucun haplotype attribué auparavant à l'un des haplogroupes ont été attribués différemment avec d'avantage de séquences considérées. La seule exception était l'haplotype w20, mais son affectation était auparavant ambiguë.

La comparaison des séquences de la région de contrôle des 230 pb de loups gris de toute l'aire de répartition de l'espèce a révélé 75 haplotypes différents : 23 se sont produits en Europe, 30 en Asie, 18 en Amérique du Nord, 3 en Europe et en Asie et 1 en Europe et Amérique du Nord (tableau S1 en fichier 1). Les haplotypes de loups Indiens et Himalayens ont formé des lignées clairement distinctes

(figure 2), compatibles avec les études antérieures [20,22]. À l'exception des loups Indiens et l'Himalayens, les haplotypes des différents continents n'ont pas été groupé en clades séparés, et aucune unités significatives (telles que définies dans la référence [43]) ne peuvent être distinguées. Le caractère distinctif des haplogroupes européens 1 et 2 ont été maintenus lorsque les haplotypes des loups d'autres continents ont été incorporés à l'ensemble des données (figures 2 et S5).

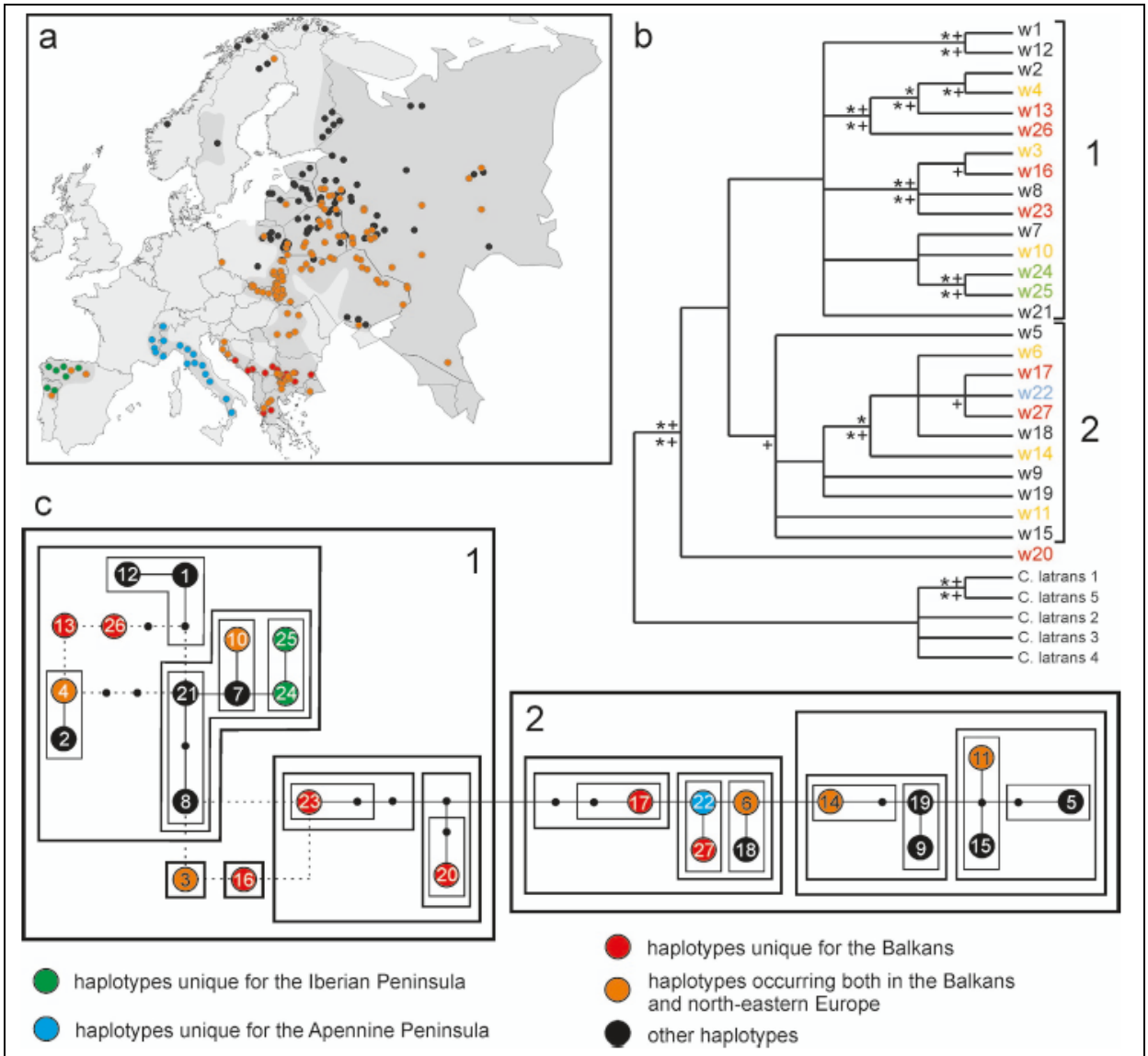

Figure 1 : Distribution spatiale et relations phylogénétiques entre les haplotypes d'ADNmt de loups européens contemporains. Basé sur 230 séquences bp. (a) Répartition des différents haplotypes de loups en Europe, dans le contexte de l'aire de répartition actuelle des loups (basé sur la référence [54], modifiée). (b) Arbre de parcimonie maximum (consensus de règle de majorité de 50%) des haplotypes d'ADNmt de loups européens. Prise en charge de Bootstrap, si trouvé dans plus de 50% sur 1000 répliques, est indiqué comme suit : étoiles au-dessus des branches pour l'arbre du maximum de vraisemblance, étoiles sous les branches pour l'arbre d'évolution minimum, et "+" au-dessus des branches pour l'arbre de parcimonie maximum. "+" sous les branches indique les valeurs de crédibilité du clade pour l'arbre bayésien avec un coalescent avant, si supérieur à 0,5. Deux haplogroupes principaux correspondent aux clades principaux du réseau. L'affectation de l'haplotype w20 a un haplogroupe reste ambigu. (c) Réseau de parcimonie statistique des haplotypes d'ADNmt de loups européens. Les grands cercles représentent les haplotypes et les petits cercles indiquent les nœuds intérieurs qui étaient absents de l'échantillon en raison d'un échantillonnage insuffisant ou d'haplotypes éteints. Chaque ligne représente un seul changement mutationnel. Les lignes pointillées indiquent des connexions mutationnelles alternatives. Des haplotypes similaires sont regroupés en clades imbriqués, désignés par des rectangles.

Histoire phylogéographique et démographique passée des loups européens

En appliquant la méthode de la courbe de raréfaction [33], nous avons estimé le nombre total d'haplotypes actuellement présents chez les loups européens contemporains à 29 ans (28,72 ± 1,29 ; voir également le fichier supplémentaire 1). Ainsi, l'échantillon analysé, qui comprenait 27 des 29 haplotypes attendus, était représentatif de la population européenne. Régulièrement, la même analyse effectuée pour les populations d'Europe de l'Est seulement (avec 24 haplotypes échantillonnés) a donné une estimation de 26 haplotypes (25,82 ± 1,38).

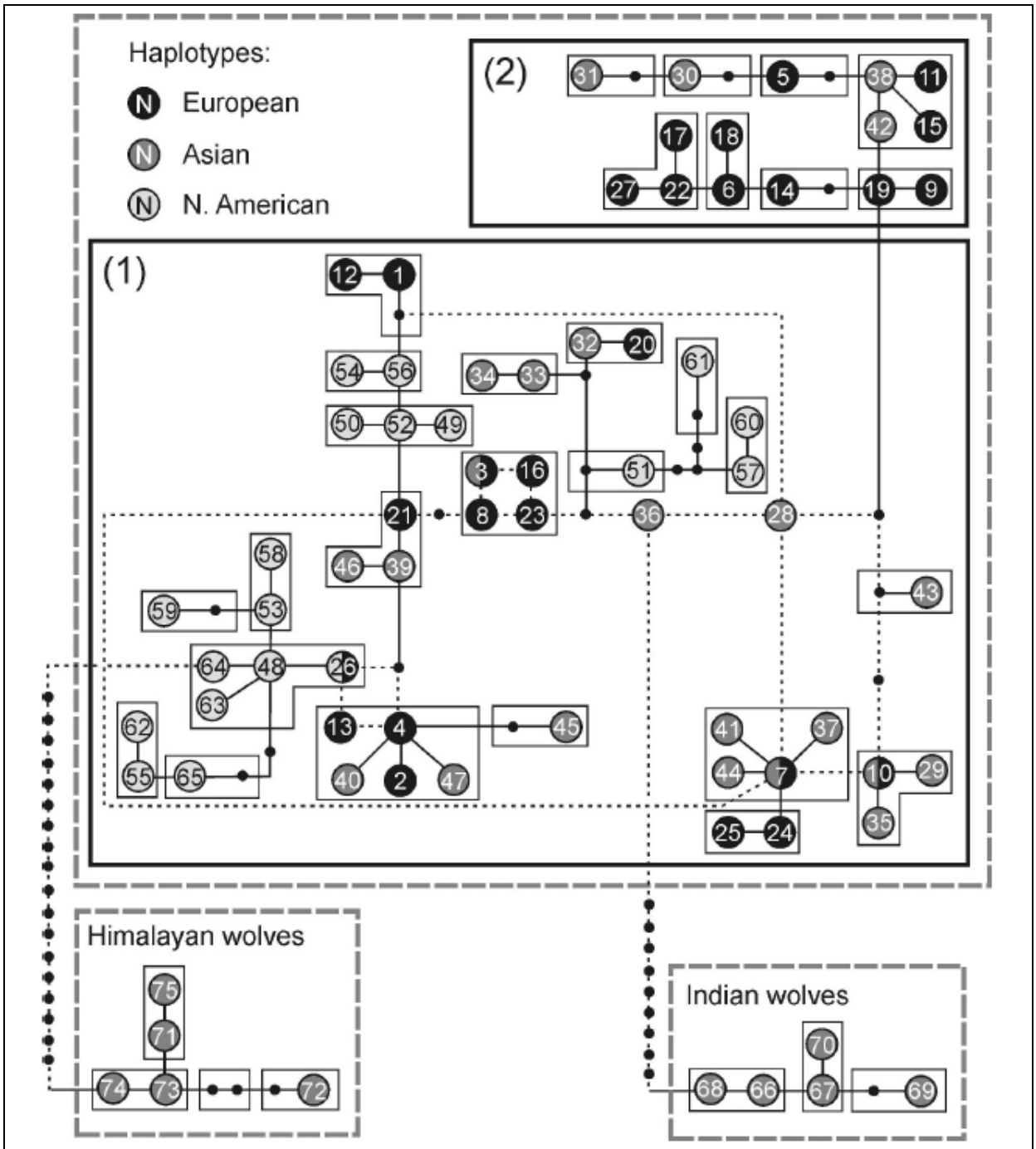

Figure 2 : Réseau de parcimonie statistique d'haplotypes d'ADNmt de loups gris du monde entier. Basé sur des séquences de 230 paires de bases. Autant de connexions alternatives mutationnelles sont présentes dans le réseau, seuls les clades de premier niveau sont présentés pour rendre l'image plus claire. Deux rectangles en pointillés indiquent les groupes d'haplotypes correspondant aux clades 1 et 2 de la figure 1c. Les haplotypes propres à un continent sont marqués d'une seule couleur et les haplotypes se produisant sur deux continents sont marqués de deux couleurs respectives. Les haplotypes de loups Indiens et Himalayens ont été séparés de tous les autres haplotypes par plus de 6 étapes de mutation, ce qui dénote le seuil de la connexion parcimonieuse à 95%.

La répartition géographique des haplotypes des loups européens n'a pas indiqué de modèles phylogéographiques clair (Figure 1). Cependant, nous avons observé une fréquence élevée d'haplotypes uniques dans le sud de l'Europe. Dans la Péninsule Apennine, un seul haplotype d'ADNmt (w22) s'est produit, ce qui était unique pour cette région. Dans la péninsule ibérique, **deux** haplotypes uniques ont été trouvés dans 73% des échantillons et dans les Balkans, **sept** haplotypes uniques ont été trouvés dans 45% des échantillons. Sur les 17 haplotypes européens restants, sept ont été trouvés dans les parties centrale et nord-est du continent et dans les Balkans (figure 1a). Un haplotype (w10) était commun aux Balkans et à la péninsule ibérique, et a également eu lieu dans le Caucase. Tous les haplotypes des loups ibériques contemporains appartenaient à l'haplogroupe 1, tandis que le seul haplotype de l'Apennin contemporain appartenaient à l'haplogroupe 2. En Europe de l'Est, ces deux haplogroupes avaient des distributions très chevauchantes (Figure 3). L'haplogroupe 1 prédomine dans cette région, survenant chez 87% des individus.

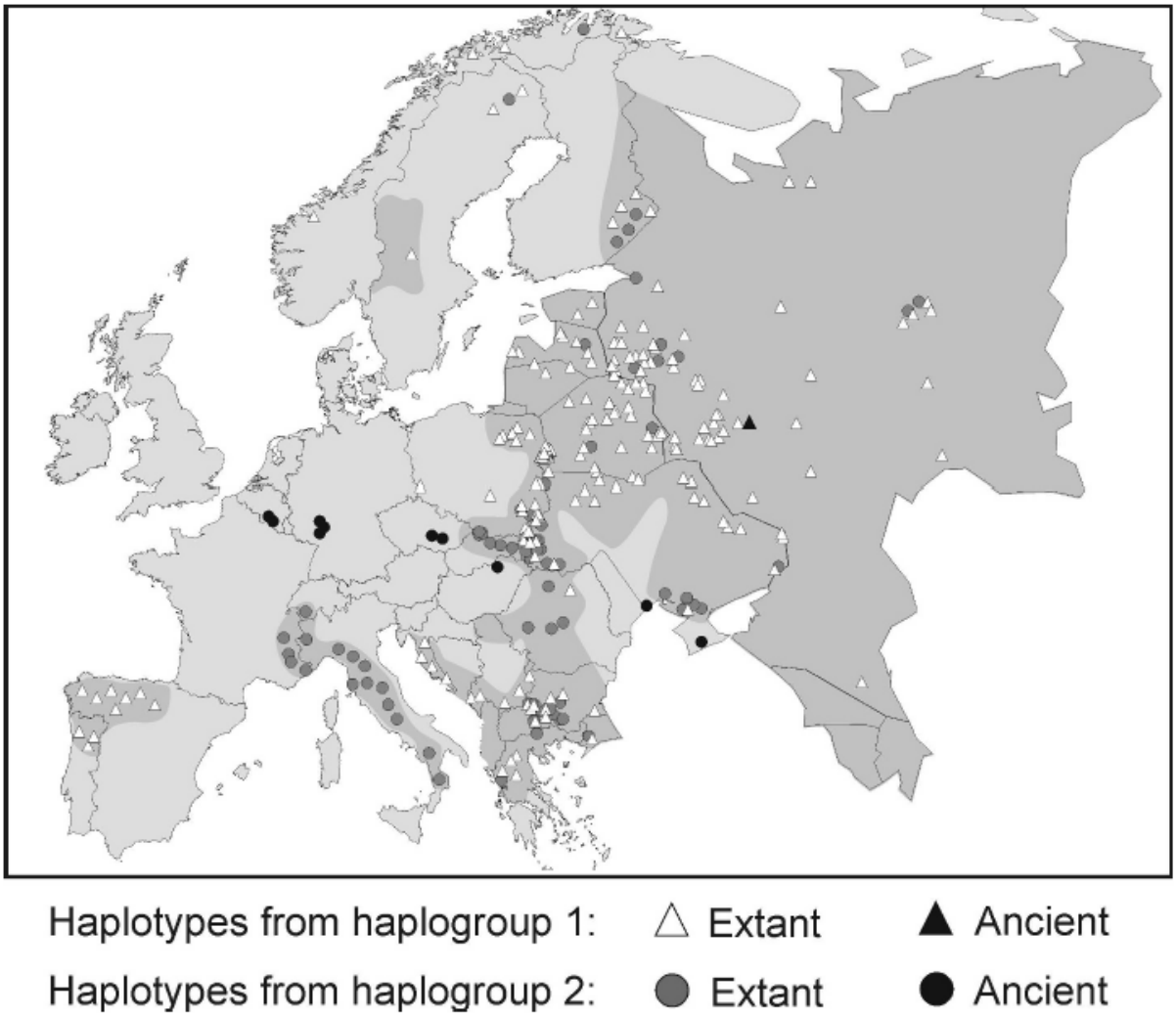

Figure 3 Distribution of haplogroups 1 and 2 in contemporary and ancient European wolves. The map is based on the authors' data and the data from other studies [13-17,24].

Chez les anciens loups européens, l'haplogroupe 2 était prédominant. Tous les échantillons anciens de Belgique, d'Allemagne, de République tchèque, de Hongrie et d'Ukraine, selon l'âge de 44 000 à 1 400 ans B.P., appartenait à cet haplogroupe. Un seul haplotype de loup ancien (w7), échantillonné dans l'ouest de la Russie et datée entre 2700 et 1200 ans, appartenait à l'haplogroupe 1 (figures 3, 4 et S6). En supposant des fréquences contemporaines des haplogroupes 1 et 2 dans l'ensemble de la population européenne (respectivement 76% et 24%), la probabilité que 23 des 24 individus choisis au hasard appartiendrait à l'haplogroupe 2 est de $1{,}01 \times 10^{-13}$. Et la probabilité serait supérieure à 0,05 si la fréquence de l'haplogroupe 2, était au moins de 82,5%. Ainsi, la prédominance de l'haplogroupe 2

dans les échantillons de loups anciens reflète très probablement sa prédominance dans la population antique.

L'analyse BEAST basée sur une combinaison de données d'anciennes et contemporaines ont indiqué que les modèles était une taille de population constante, toute période considérée (support du facteur Bayes contre les autres modèles se situaient entre 5 et 973). Le taux de substitution estimé sur la base de ce modèle était de $2,9 \times 10^{-6}$ (95% HPDI : $4,9 \times 10^{-7 - 6,4} \times 10^{-6}$). Quand l'analyse BEAST a été réalisée sur la base contemporaine, plus de données de séquence uniquement, le modèle le plus fortement pris en charge était l'expansion démographique récente (soutien du facteur Bayes contre d'autres modèles se situait entre 1,38 et 10^{6}). Quant au résultat du taux de substitution beaucoup plus lent appliqué (5×10^{-8}), l'échelle de temps des changements de densité était différente, par rapport au même modèle pour les données anciennes (Figures S7a et S7b dans le fichier supplémentaire 1). Les estimations de temps jusqu'à l'ancêtre commun le plus récent (TMRCA) et la taille effective de la population, différait également considérablement entre les deux ensembles de données (tableau S2 dans fichier 1).

L'expansion démographique récente des loups européens suggérée par l'analyse BEAST des données contemporaines était compatible avec les preuves d'expansion déduites des paramètres génétiques de la population. La population contemporaine de loups européens avait une diversité haplotypique élevée (0,88), une diversité nucléotidique relativement faible (0,022) et un rapport *s/d* élevé (4,21), conforme à une expansion démographie récente [41]. La distribution cohérente et non concordante de tous les haplotypes européens contemporains s'écartent de l'attente d'un modèle d'expansion soudaine (indice de déchirure = 0,029, P = 0,10). Le test de $F_{u's}$ [40] de neutralité sélective a indiqué un résultat négatif, bien que la valeur F_S soit insignifiante (F_S = -3,88, P = 0,18).

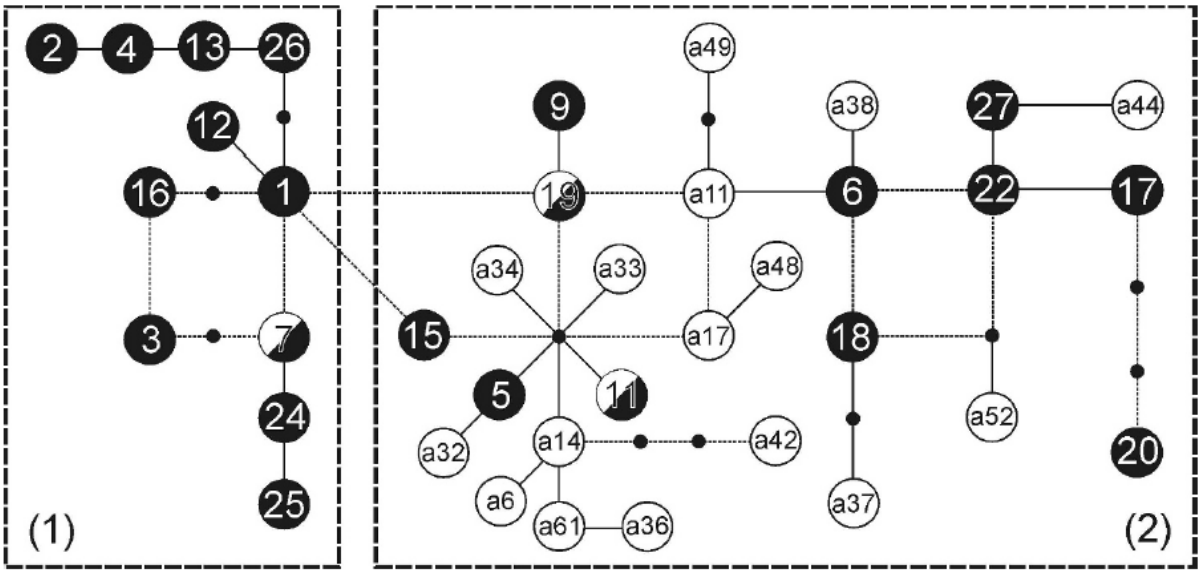

Figure 4 : Réseau de parcimonie statistique d'haplotypes d'ADNmt de loups européens contemporains (noirs) et anciens (blancs). Basé sur 57 séquences bp. Les haplotypes contemporains proviennent d'études publiées ou de GenBank (voir le tableau S1 dans le fichier supplémentaire 1), et les haplotypes anciens d'après Stiller et al. [24]. Trois haplotypes anciens sont identiques aux haplotypes existants (noir et blanc). De fines lignes pointillées indiquent les connexions de mutations alternatives. Deux rectangles en traits pointillés épais désignent des haplogroupes correspondant aux clades 1 et 2 de la figure 1c.

DISCUSSION

Nous avons constaté qu'à l'exception des lignages de l'Inde et de l'Himalaya, le spectacle contemporain mondial des loups gris, n'a pas d'unités évolutives significatives, en termes de réciprocité des clades monophylétiques à distributions allopatriques [43], ce qui est cohérent avec les études antérieures [14, 20, 22]. Deux principaux haplogroupes de loups gris du monde entier, correspondant aux haplogroupes européens 1 et 2, incluent à la fois les Haplotypes européens et asiatiques, et l'un d'eux comprenait également des haplotypes nord-américains. Ainsi, les haplogroupes européens 1 et 2 n'ont formé aucun Clade européen, mais ils représentaient une subdivision majeure au sein de la population mondiale de loups.

Nous avons trouvé des différences substantielles dans les fréquences des deux haplogroupes entre populations européennes de loups contemporains, avec l'haplogroupe 1, fixé dans la péninsule ibérique et prédominant en Europe de l'Est et dans l'haplogroupe 2, fixés dans la péninsule des Apennins. Les populations Ibériques et Apennines ont une diversité génétique très réduite, probablement résultant de goulots d'étranglement historiques [14,15], et la fixation d'un haplogroupe particulier peut résulter d'une forte dérive. La fixation d'un seul haplotype dans la péninsule des Apennins, empêche de tirer des conclusions sur l'intensité du flux génétique passé, entre cette population et les populations d'Europe de l'Est. Cependant, l'analyse des données contemporaines d'ADN nucléaire, suggèrent que les loups Italiens ont été génétiquement isolés pendant des milliers de générations au sud des Alpes [44]. En revanche, la présence d'un haplotype partagé (**w10**) entre la péninsule ibérique et l'Europe de l'Est soutient fermement un flux génétique passé entre ces deux populations, impliquant la présence de l'haplogroupe 1 dans les populations intermédiaires éteintes d'Europe centrale et occidentale.

Contrairement à ces attentes, les haplotypes de tous les loups anciens d'Europe centrale et occidentale, âgés de 44000 à 1400 ans BP, appartiennent à l'haplogroupe 2. Cela peut refléter la prédominance historique de l'haplogroupe 2 en Europe centrale et occidentale il y a 40 000 ans, à la fois avant et après le LGM. Bien que les séquences anciennes étaient très courtes, nous avons basé notre inférence sur la distribution des haplogroupes plutôt que des individus haplotypes, et les données analysées nous ont donné une résolution suffisante à cet effet. Nos résultats sont cohérents avec Germonpre et al. [45], qui ont montré que les haplotypes européens anciens sont placés dans une partie du réseau d'haplotypes plutôt que d'être dispersés sur l'ensemble du réseau. Bien que l'haplogroupe des échantillons anciens d'Europe centrale soient cohérents avec l'haplogroupe contemporain le plus adjacent des Carpates (voir Figure 3), l'absence totale d'haplogroupe 1 dans les échantillons anciens d'Europe occidentale, ne correspond pas aux attentes basées sur la distribution globale des haplogroupes dans les populations européennes contemporaines. Le manque d'haplogroupe 1 dans les échantillons anciens est peu susceptible de résulter du biais d'échantillonnage, car plusieurs emplacements éloignés dans le centre et l'Europe occidentale ont été échantillonnés. Par conséquent, l'incohérence des fréquences des deux haplogroupes dans l'échantillons anciens avec les motifs révélés des données contemporaines, peuvent suggérer des changements substantiels dans les fréquences de l'haplogroupe au cours des 40 000 dernières années à partir de la prédominance de l'haplogroupe 2 à la prédominance de haplogroupe 1.

Un remplacement d'haplogroupe parallèle a été signalé pour les loups gris d'Amérique du Nord. Leonard et coll. [10] ont montré que les haplotypes d'ADNmt des loups du Pléistocène de l'Est de la Béringie appartenait à un haplogroupe distinct, qui n'est pas présent chez les loups nord-américains contemporains. Les haplogroupes correspondant à l'haplogroupe 2 dans notre étude (voir le tableau S3 dans le fichier supplémentaire 1), et certains des anciens loups européens et Béringiens partageaient un même haplotype (haplotype a17 sur la figure 4) [10]. Les données morphologiques et isotopiques suggèrent que les loups Béringiens étaient des chasseurs et des charognards spécialisés de mégafaune (s'attaquant principalement au cheval *Equus lambei* et au bison *Bison bison*), et leur extinction était liée à l'extinction de leurs proies mégafaunales [10]. Selon Hofreiter [46], cela peut impliquer que les loups du Pléistocène dans le nord de l'Eurasie et d'Amérique, peuvent avoir représenté une population

continue et presque **panmictique** génétiquement et probablement aussi écologiquement distinct des loups vivant dans cette région aujourd'hui. La proximité phylogénétique des haplotypes d'ADNmt à elle seule, impliquent directement une similitude écologique, mais la rend probable, tenant compte d'une corrélation significative entre la différenciation génétique et écologique des loups [13, 47, 49]. En effet, il a été démontré que les loups de Béringie à la fin du Pléistocène, qui ont été génotypés par Stiller et al. [24] chassaient des chevaux et des grands bovidés [45], ce qui correspond au régime alimentaire des loups Béringiens [10].

Contrairement à l'Amérique du Nord, l'haplogroupe 2 ne s'est pas éteint en Europe. Des haplotypes de ce groupe se sont produits dans les échantillons de loups d'Allemagne occidentale datés de 2,200 à 1,400 ans avant notre ère, et sont toujours présents en fréquences chez les loups contemporains d'Europe et d'Asie. Bien que le remplacement de l'haplogroupe ait été complet en Amérique du Nord et partiel en Europe, et le fait que la direction des changements de fréquence était la même dans les deux cas, suggère qu'il ne s'agissait pas d'événements aléatoires, mais qu'ils étaient associés à des changements écologiques après le LGM. Si avant le LGM l'haplogroupe 2 était exclusivement associé au loup **écomorphe,** spécialisé dans les proies mégafaunale, cela signifierait qu'en Europe, il était capable de s'adapter à l'évolution de la composition et la disponibilité des proies. Peut-être que ces changements en Europe n'étaient pas aussi substantiels et aussi rapide qu'en Amérique du Nord. Par exemple, le cheval - soi-disant l'une des espèces proies les plus importantes des loups du Pléistocène [10,45] - ne s'est pas éteint en Europe, contrairement à l'Amérique du Nord [par ex. [50]]. Les facteurs écologiques, y compris la spécialisation des proies, jouent un rôle important dans l'élaboration des processus génétiques et démographiques des populations contemporaines de loups et d'autres carnivores [par exemple [13,47-49,51]], et il est probable qu'il a eu un effet similaire sur la démographie et l'évolution des processus dans les populations anciennes.

Les processus démographiques passés de la population de loups européens, ne pouvait être reconstruit que de manière limitée. Les modèles bayésiens coalescents (implémentés dans BEAST) en utilisant des données contemporaines, ainsi que la génétique des populations, des statistiques comme la distribution de l'inadéquation des données suggèrent une expansion démographique de la population de loups européens depuis plusieurs milliers d'années (voir la figure S7a Fichier supplémentaire 1). Cependant, le petit nombre d'anciens échantillons et de lieux d'échantillonnage, associés à l'absence de données contemporaines au nord-ouest de l'Europe en raison de extinction de la population, empêche une vision plus détaillée de l'histoire démographique de l'espèce. L'analyse BEAST basée sur la combinaison de données anciennes et contemporaines a donné le plus de soutien au modèle de taille de population constante sur toute la période considérée, ce qui indique que les données disponibles ne contenaient pas suffisamment d'informations pour déduire l'histoire de la population. Le moment des événements démographiques n'ont pas pu être déduits de manière fiable avec les données disponibles non plus, car les séquences courtes des échantillons anciens empêchaient des estimations précises. Le taux de substitution estimé à partir des données anciennes était très élevé, ce qui peut être dû à un très court fragment de la région de contrôle étudiée, qui comprenait un grand nombre de sites variables (voir la figure S2 dans le fichier supplémentaire 1). Cependant, l'IDHP à 95% de cette estimation était large et chevauchait celles estimées pour la région témoin d'autres mammifères et oiseaux basée sur des données d'ADN ancien [52]. Le faible nombre d'échantillons anciens analysés et la présence d'une structure de population, peut conduire à une surestimation du taux de mutation [53], et cela peut être le cas dans notre étude. La reconstruction plus détaillée de l'histoire de la population de loups en Europe, exige l'analyse de données de séquence pour un ensemble plus étendu d'échantillons anciens avec une distribution spatiale et temporelle complète.

CONCLUSIONS

Cette étude, combinant les données génétiques sur la vaste population de loups européens contemporains avec la publication de données sur les anciens loups européens, suggèrent des changements de fréquence et de distribution des deux principaux haplogroupes d'ADNmt tout au long du Pléistocène tardif et de l'Holocène. Ces deux haplogroupes représentent une subdivision majeure au sein de la population mondiale de loups, et coexiste en Eurasie. En Amérique du Nord, l'un de ces haplogroupes était associé à un **écomorphe** de loup distinct, qui s'est éteint à la fin du Pléistocène [10]. Nous avons constaté que le même haplogroupe a diminué en fréquence en Europe depuis lors. La similarité des changements génétiques de la population de cette espèce, qui a eu lieu en Europe et en Amérique du Nord, suggère qu'ils peuvent être entraînés par les mêmes processus écologiques associés avec la transition Pléistocène / Holocène.

En raison d'une population très complexe et spécifique à l'espèce de l'histoires des mammifères du Pléistocène tardif, la compréhension du mécanisme général qui façonne leur dynamique est particulièrement difficile. La comparaison des histoires des populations des mêmes espèces dans différentes parties de leurs aires de répartition, peut être un moyen efficace d'aborder ce problème, car il fournit la possibilité de distinguer les tendances générales des événements spécifiques à un cas. D'autres études comparatives combinant de nombreuses données génétiques et écologiques sur les populations, sont nécessaires pour améliorer nos connaissances sur les processus évolutionnaires façonnant l'histoire des populations du Pléistocène tardif.

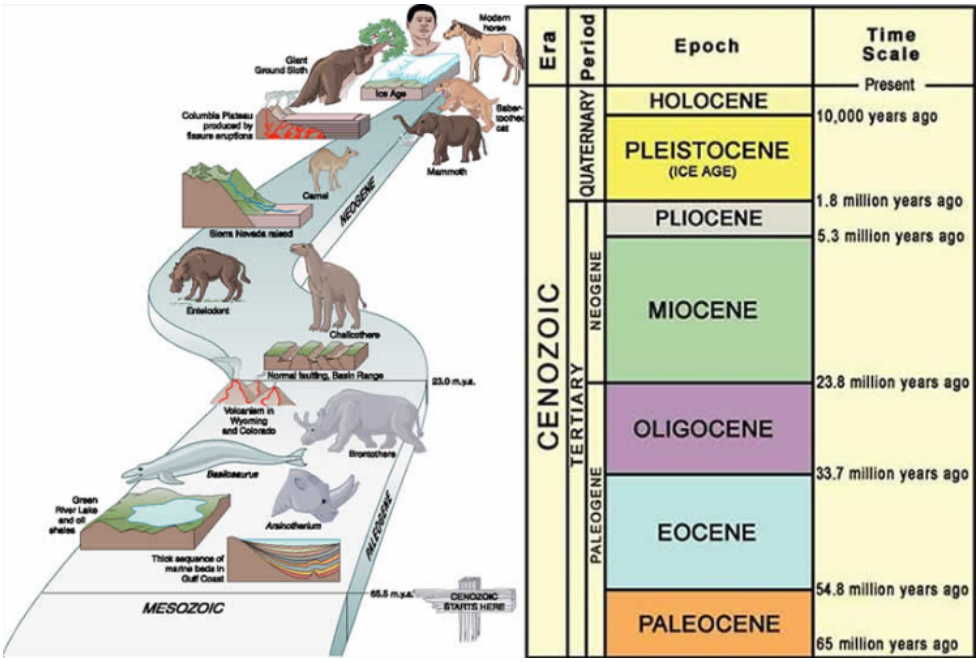

Figure externe à l'article, tirée d'internet